

PCT/JP 2004/016891

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

05.11.2004

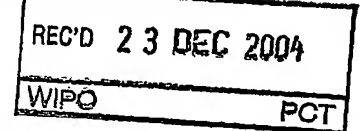
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 1 月    7 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 7 9 1 6 7  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 7 9 1 6 7 ]

出    願    人                      花 王 株 式 会 社  
Applicant(s):

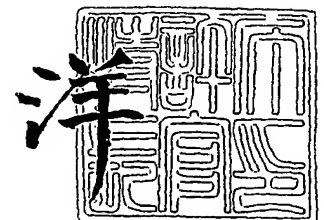


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P05021511  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 1/00  
C12N 15/00

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 東畑 正敏

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 澤田 和久

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 小野口 敬子

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 小澤 忠弘

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 尾崎 克也

【発明者】  
【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 奈良先端科学技術大学院大学  
情報科学研究科内  
【氏名】 小林 和夫

【発明者】  
【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 奈良先端科学技術大学院大学  
情報科学研究科内  
【氏名】 小笠原 直毅

【特許出願人】  
【識別番号】 000000918  
【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】  
【識別番号】 110000084  
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所  
【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】  
【識別番号】 100068700  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】  
【識別番号】 100077562  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】  
【識別番号】 100096736  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】  
 【識別番号】 100101317  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】  
 【識別番号】 100117156  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】  
 【識別番号】 100111028  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】  
 【予納台帳番号】 164232  
 【納付金額】 21,000円

【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成14年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構、生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】  
 【物件名】 特許請求の範囲 1  
 【物件名】 明細書 1  
 【物件名】 図面 1  
 【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

枯草菌の遺伝子 comA、yopO、treR、yvbA、cspB、yvaN、yttP、yurK、yoza、licR、sigL、mntR、glcT、yvdE、ykvE、slr、rocR、ccpA、yaaT、yvaA、yycH、yacP、hprK、rsiX、yhdK 及び y1b0 のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか 1 以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

## 【請求項 2】

微生物が枯草菌又はその他のバチルス属細菌である請求項 1 記載の組換え微生物。

## 【請求項 3】

異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子上流に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌用シグナル領域を結合した請求項 1 又は 2 記載の組換え微生物。

## 【請求項 4】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、バチルス属細菌のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子上流 0.6 ~ 1 kb 領域に由来するものである請求項 3 記載の組換え微生物。

## 【請求項 5】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、配列番号 1 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1 ~ 659 の塩基配列、配列番号 3 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1 ~ 696 の塩基配列又は当該塩基配列のいずれかと 70 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA 断片、又は当該塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなる DNA 断片である請求項 3 記載の組換え微生物。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】組換え微生物

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に用いる組換え微生物、及びタンパク質又はポリペプチドの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬や、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

【0003】

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。特に最近では、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、遺伝子組換え技術等を用いたより効率的な生産菌の育種が行われるようになっており、遺伝子組換えのための宿主微生物の開発が進められている。例えば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Marburg No.168系統株の様に宿主微生物として安全かつ優良と認められた微生物菌株に更に改良を加えた菌株が開発されている。

【0004】

しかしながら、微生物は元来、自然界における環境変化に対応するための多種多様な遺伝子群を有しており、限定された生産培地が使用されるタンパク質等の工業的生産においては、必ずしも生産効率が高いとは言えない状況であった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物にタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、微生物ゲノム上にコードされる各種遺伝子において、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な働きをする遺伝子群を鋭意探索したところ、枯草菌等の微生物の特定の遺伝子をゲノム上から削除又は不活性化した後、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入することにより、目的のタンパク質又はポリペプチドの生産性が、削除又は不活性化前と比較して向上することを見出した。

【0007】

すなわち本発明は、枯草菌の遺伝子 *comA*、*yopO*、*treR*、*yvbA*、*cspB*、*yvaN*、*yttP*、*yurK*、*yoza*、*licR*、*sigL*、*mntR*、*glcT*、*yvdE*、*ykvE*、*slr*、*rocR*、*ccpA*、*yaaT*、*yvaA*、*yycH*、*y*、*acP*、*hprK*、*rsiX*、*yhdK*及び *ylbO* のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか1以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物変異株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、特に異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の下流に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域、又は分泌用シグナル領域を結合した当該組換え微生物、また当該組換え微生物を用いたタンパク質又はポリペプチドの製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明の微生物は、目的タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要、或いは有害な遺伝子が削除、又は不活性化されているため、エネルギーロス、副産物の生産や比生産速度の低下等、培地の浪費が大幅に減少でき、また、タンパク質又はポリペプチドの生産期間が長期化することによって効率よく目的生産物を生産することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明においてアミノ酸配列および塩基配列の同一性はLipman-Pearson法 (Science, 27, 1435, (1985))によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。

【0010】

本発明の微生物を構築するための親微生物としては、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要な遺伝子、具体的には表1に示す枯草菌の遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子を有するものであればよく、野生型のものでも変異を施したもののよい。具体的には、枯草菌などのバチルス (*Bacillus*) 属細菌や、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、或いは酵母等が挙げられ、中でもバチルス (*Bacillus*) 属細菌が好ましい。更に、全ゲノム情報が明らかにされ、遺伝子工学、ゲノム工学技術が確立されている点、またタンパク質と菌体外に分泌生産させる能力を有する点から特に枯草菌が好ましい。

【0011】

本発明の微生物を用いて生産する目的タンパク質又はポリペプチドとしては、例えば食品用、医薬品用、化粧品用、洗浄剤用、繊維処理用、医療検査薬用等として有用な酵素や生理活性因子等のタンパク質やポリペプチドが挙げられる。

【0012】

例えば、枯草菌にはゲノム上に4106個の遺伝子が存在することが知られているが、本発明において削除、又は不活性の対象となる遺伝子群は、目的タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な働きをする遺伝子群であり、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子群の中から選択されるものである。斯かる遺伝子群は、目的タンパク質又はポリペプチドの生産には直接関与しておらず、また、通常の工業的生産培地における微生物の生育にも不要であることが本発明者らによって見出された。

【0013】

尚、表中の各遺伝子の名称、番号及び機能等は、Nature, 390, 249-256, (1997) で報告され、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for *Bacillus subtilis* (BSORF DB) でインターネット公開 (<http://bacillus.genome.ad.jp/>、2003年6月17日更新) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載している。

【表 1】

遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子機能など
<i>comA</i>	BG10381	2 成分制御系制御因子
<i>yopO</i>	BG13648	推定転写制御因子、sp $\beta$ プロファージタンパク質
<i>treR</i>	BG11011	トレハロースオペロンの転写抑制因子 (GntRファミリー)
<i>yvbA</i>	BG14078	推定転写制御因子 (ArsRファミリー)
<i>cspB</i>	BG10824	低温ショック対応主要因子
<i>yvaN</i>	BG14069	推定転写制御因子
<i>yttP</i>	BG13927	推定転写制御因子 (TetRファミリー)
<i>yurK</i>	BG13997	推定転写制御因子 (GntRファミリー)
<i>yoza</i>	BG13748	推定転写制御因子 (ArsRファミリー)
<i>licR</i>	BG11346	転写制御因子 (アンチターミネーター)、リケナンオペロン ( <i>licB</i> <i>CAH</i> ) 制御
<i>sigL</i>	BG10748	RNAポリメラーゼ $\sigma$ 因子 ( $\sigma 54$ 型)
<i>mntR</i>	BG11702	マンガン輸送制御
<i>glcT</i>	BG12593	<i>ptsGHI</i> オペロン発現必須な転写制御因子 (BglGファミリー、アンチターミネーター)
<i>yvdE</i>	BG12414	推定転写制御因子 (LacIファミリー)
<i>ykvE</i>	BG13310	推定転写制御因子 (MarRファミリー)
<i>slr</i>	BG11858	コンピテンス及び孢子形成関連遺伝子の転写活性化因子
<i>rocR</i>	BG10723	アルギニン資化オペロンの転写活性化因子 (NtrCファミリー)
<i>ccpA</i>	BG10376	炭素源異化代謝抑制関与転写制御因子 (LacIファミリー)
<i>yaaT</i>	BG10096	II 型シグナルペプチダーゼ類似タンパク質
<i>yyaA</i>	BG10057	DNA結合タンパク質 Spo0J 類似タンパク質
<i>yycH</i>	BG11462	機能未知 (他生物に相同遺伝子あり)
<i>yacP</i>	BG10158	機能未知 (他生物に相同遺伝子あり)
<i>hprK</i>	BG14125	Hprタンパク質 Ser 残基リン酸化/脱リン酸化酵素
<i>rsiX</i>	BG10537	アンチ $\sigma X$ 因子
<i>yhdK</i>	BG13017	機能未知、 $\sigma M$ 因子の発現抑制関連
<i>ylbO</i>	BG13367	$\sigma E$ 関与母細胞内遺伝子の発現調節

## 【0014】

また、表 1 に示される枯草菌の各遺伝子と同じ機能を有する、または、表 1 の各遺伝子と塩基配列において 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上の同一性を有する、他の微生物由来、好ましくはバチルス属細菌由来の遺伝子は、表 1 に記載の遺伝子に相当する遺伝子と考えられ、本発明において削除、不活性化すべき遺伝子に含まれる。尚、塩基配列の同一性は Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) によって計算される。

## 【0015】

表 1 に示される枯草菌の遺伝子群の中には、各種遺伝子発現の活性化や抑制に関わる制御遺伝子、或いは構造の類似性から制御遺伝子であろうと推定されるものが多く存在していることから、タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な遺伝子制御の存在が本発明によって明らかになった。

## 【0016】

特に、グルコースの P T S 取り込み系オペロンのアンチターミネーターである *glcT* 遺伝子、リケナン分解系オペロンのアンチターミネーターである *licT* 遺伝子、トレハロース取り込み、代謝系オペロンのリプレッサーである *treR* 遺伝子、更には、グルコースカタボライトリプレッションに関わる *ccpA* 遺伝子や *hprK* 遺伝子など、糖の取り込み、代謝に関わる

制御遺伝子が多く存在しており、注目に値する。

【0017】

その他、糖の取り込み、代謝に関わる制御遺伝子以外の制御遺伝子として、アルギニン資化の活性化に関与する rocR 遺伝子やコンピテンス関連の制御遺伝子 comA、slr 等を削除又は不活性化することによりタンパク質又はポリペプチドの生産性が向上する。

【0018】

また、表1に示される遺伝子群の中には、ECFシグマ因子のひとつであるシグマXの発現を抑制するアンチECFシグマ因子をコードする rsiX 遺伝子、及び同じくシグマMの発現抑制に関与するとの報告例がある yhdK 遺伝子 (Mol Microbiol., 32, 41, (1999)) などが存在し、また逆にシグマLをコードする sigL 遺伝子が含まれており、シグマXやシグマMの制御下にある遺伝子の発現がタンパク質生産にとって好ましく、逆にシグマL制御下の何らかの遺伝子発現がタンパク質生産にとって好ましくないことが示唆されている。

【0019】

斯かる遺伝子群の中から選ばれる1又は複数の遺伝子を削除又は不活性化することにより、タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要な、或いは有害な遺伝子の発現が生じないため、当該タンパク質又はポリペプチドの生産において、その生産性の向上が達成される。

【0020】

尚、削除又は不活性化する遺伝子は1以上であればよく、複数、特に3以上が好ましく、更には5以上であることが好ましい。更に本発明の微生物の構築には、上記以外の遺伝子群の削除又は不活性化を組み合わせることも可能であり、生産性向上に対してより大きな効果が期待される。また、本発明は目的遺伝子中に他のDNA断片を挿入する、あるいは、当該遺伝子の転写・翻訳開始領域に変異を与える等の方法によって目的遺伝子を不活性化することによっても達成できるが、好適には、標的遺伝子を物理的に削除する方がより望ましい。

【0021】

遺伝子群の削除又は不活性化手順としては、表1に示した標的遺伝子を計画的に削除又は不活性化する方法のほか、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化変異を与えた後、適当な方法によりタンパク質生産性の評価及び遺伝子解析を行う方法が挙げられる。

【0022】

標的とする遺伝子を削除又は不活性化するには、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、標的遺伝子の一部を含むDNA断片を適当なプラスミドベクターにクローニングして得られる環状の組換えプラスミドを親微生物細胞内に取り込ませ、標的遺伝子の一部領域に於ける相同組換えによって親微生物ゲノム上の標的遺伝子を分断して不活性化することが可能である。或いは、塩基置換や塩基挿入等によって不活性化した標的遺伝子、又は標的遺伝子の外側領域を含むが標的遺伝子を含まない直鎖状のDNA断片等をPCR等の方法によって構築し、これを親微生物細胞内に取り込ませて親微生物ゲノムの標的遺伝子内の変異箇所の外側の2ヶ所、又は標的遺伝子外側の2ヶ所の領域で2回交差の相同組換えを起こさせることにより、ゲノム上の標的遺伝子を削除或いは不活性化した遺伝子断片と置換することが可能である。

【0023】

特に、本発明微生物を構築するための親微生物として枯草菌を用いる場合、相同組換えにより標的遺伝子を削除又は不活性化する方法については、既にいくつかの報告例があり (Mol. Gen. Genet., 223, 268 (1990)等)、こうした方法を繰り返すことによって、本発明の宿主微生物を得ることができる。

【0024】

また、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化についてもランダムにクローニングしたDNA断片を用いて上述の方法と同様な相同組換えを起こさせる方法や、親微生物に $\gamma$ 線等を照射すること等によっても実施可能である。

【0025】



以下、より具体的にSOE (splicing by overlap extension) - PCR法 (Gene, 77, 61, (1989)) によって調製される削除用DNA断片を用いた二重交差法による削除方法について説明するが、本発明に於ける遺伝子削除方法は下記に限定されるものではない。

#### 【0026】

本方法で用いる削除用DNA断片は、削除対象遺伝子上流に隣接する約0.5～3 kb断片と、同じく下流に隣接する約0.5～3 kb断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片を挿入した断片である。まず、1回目のPCRによって、削除対象遺伝子上流断片及び下流断片、並びに薬剤耐性マーカー遺伝子断片の3断片を調製するが、この際、例えば、上流断片の下流末端に薬剤耐性マーカー遺伝子上流側10～30塩基対配列、逆に下流断片の上流末端には薬剤耐性マーカー遺伝子下流側10～30塩基対配列が付加される様にデザインしたプライマーを用いる (図1)。

#### 【0027】

次いで、1回目に調製した3種類のPCR断片を鋳型とし、上流断片の上流側プライマーと下流断片の下流側プライマーを用いて2回目のPCRを行うことによって、上流断片の下流末端及び下流断片の上流末端に付加した薬剤耐性マーカー遺伝子配列に於いて、薬剤耐性マーカー遺伝子断片とのアニールが生じ、PCR増幅の結果、上流側断片と下流側断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子が挿入したDNA断片を得ることができる (図1)。

。

#### 【0028】

薬剤耐性マーカー遺伝子として、クロラムフェニコール耐性遺伝子を用いる場合、例えば表2に示したプライマーセットを用い、Pyrobest DNAポリメラーゼ (宝酒造) などの一般のPCR用酵素キット等を用いて、成書 (PCR Protocols. Current Methods and Applications, Edited by B.A.White, Humana Press, pp251 (1993)、Gene, 77, 61, (1989)等) に示される通常の条件によりSOE-PCRを行うことによって、各遺伝子の削除用DNA断片が得られる。

#### 【0029】

かくして得られた削除用DNA断片を、コンピテント法等によって細胞内に導入すると、同一性のある削除対象遺伝子上流及び下流の相同領域において、細胞内での遺伝子組換えが生じ、目標遺伝子が薬剤耐性遺伝子と置換した細胞を薬剤耐性マーカーによる選択によって分離することができる (図1)。即ち、表2に示したプライマーセットを用いて調製した削除用DNA断片を導入した場合、クロラムフェニコールを含む寒天培地上に生育するコロニーを分離し、目的の遺伝子が削除されてクロラムフェニコール耐性遺伝子と置換していることを、ゲノムを鋳型としたPCR法などによって確認すれば良い。

#### 【0030】

次に、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子から選ばれた1以上の遺伝子が削除又は不活性化された宿主微生物変異株に、目的とするタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入することによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。

#### 【0031】

目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は特に限定されず、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や、生理活性ペプチドなどが含まれる。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素 (Oxidoreductase)、転移酵素 (Transferase)、加水分解酵素 (Hydrolase)、脱離酵素 (Lyase)、異性化酵素 (Isomerase)、合成酵素 (Ligase/Synthetase) 等が含まれるが、好適にはセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素の遺伝子が挙げられる。具体的には、多糖加水分解酵素の分類 (Biochem. J., 280, 309 (1991)) 中でファミリー5に属するセルラーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセルラーゼが挙げられる。より具体的な例として、配列番号2又は4で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリセルラーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列か

らなるセルラーゼが挙げられる。

#### 【0032】

また、 $\alpha$ -アミラーゼの具体例としては、微生物由来の $\alpha$ -アミラーゼが挙げられ、特にバチルス属細菌由来の液化型アミラーゼが好ましい。より具体的な例として、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリアミラーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアミラーゼが挙げられる。尚、アミノ酸配列の同一性はLipman-Pearson法 (Science, 227, 1435, (1985))によって計算される。また、プロテアーゼの具体例としては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等が挙げられる。

#### 【0033】

また、目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、その上流に当該遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる制御領域、即ち、プロモーターおよび転写開始点を含む転写開始制御領域、リボソーム結合部位および開始コドンを含む翻訳開始領域、又、分泌用シグナルペプチド領域が適正な形で結合されていることが望ましい。例えば、特開2000-210081号公報や特開平4-190793号公報等に記載されているバチルス属細菌、すなわちKSM-S237株 (FERM BP-7875)、KSM-64株 (FERM BP-2886) 由来のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子の転写開始制御領域、翻訳開始領域、分泌用シグナルペプチド領域、より具体的には配列番号1で示される塩基配列の塩基番号1~659の塩基配列、配列番号3で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号1~696の塩基配列、また当該塩基配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA断片、あるいは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなるDNA断片が、目的タンパク質又はポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。

#### 【0034】

上記の目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子を含むDNA断片と適当なプラスミドベクターを結合させた組換えプラスミドを、一般的な形質転換法によって宿主微生物細胞に取り込ませることによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。また、当該DNA断片に宿主微生物ゲノムとの適当な相同領域を結合したDNA断片を用い、宿主微生物ゲノムに直接組み込むことによっても本発明の組換え微生物を得ることができる。

#### 【0035】

本発明の組換え微生物を用いた目的タンパク質又はポリペプチドの生産は、当該菌株を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。

#### 【0036】

以上より、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子から選ばれた1以上の遺伝子が削除又は不活性化された宿主微生物変異株、及び当該変異株を用いて組換え微生物を構築することができ、これを用いれば有用なタンパク質又はポリペプチドを効率的に生産することができる。

#### 【0037】

以下に、枯草菌の $ccpA$ 遺伝子 (BG10376) を削除した組換え枯草菌株構築の実施例を中心に、当該発明の組換え微生物の構築方法と、当該組換え微生物を用いたセルラーゼ及び $\alpha$ -アミラーゼの生産方法について具体的に説明する。

#### 【実施例】

#### 【0038】

##### 実施例1

枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、表2に示した $ccpA$ -AFと $ccpA$ -A/CmR、及び $ccpA$ -B/CmFと $ccpA$ -BRの各プライマーセットを用いて、ゲノム上の $ccpA$ 遺伝子の

上流に隣接する 0.6 kb 断片 (A)、及び下流に隣接する 0.6 kb 断片 (B) をそれぞれ調製した。一方、プラスミド pC194 (J. Bacteriol. 150 (2), 815 (1982)) のクロラムフェニコール耐性遺伝子をプラスミド pUC18 の XbaI-BamHI 切断点に挿入した組換えプラスミド pCBB31 を鋳型とし、表 2 に示した CmF と CmR プライマーセットを用いて、クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む 1 kb 断片 (C) を調製した。次に、得られた (A) (B) (C) 3 断片を混合して鋳型とし、表 2 のプライマー ccpA-AF と ccpA-BR を用いた SOE-PCR を行うことによって、3 断片を (A) (C) (B) の順になる様に結合させ、2.2 kb の DNA 断片を得た (図 1 参照)。この DNA 断片を用いてコンピテント法により枯草菌 168 株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体のゲノムを抽出し、PCR によって ccpA 遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換していることを確認した。

【0039】

【表 2-1】

プライマー	塩基配列	配列番号
comA-AF	AAGGATGATAATCCGTCCTCGTG	7
comA-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGGATGGTCATCAATCACTAG	8
comA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGCGAAATCAGACGGTGTAC	9
comA-BR	CGTCGCCTATCGCGGGGCAC	10
yopO-AF	ATGTATATAGGAGGTTGGTGGTATG	11
yopO-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGCTCTGACATGTCAACCTCC	12
yopO-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACAGATGAGAAAGGAGGAGAAG	13
yopO-BR	ATAACTGTTACTATATAATGGCC	14
treR-AF	GCTGGGGATGACGAATCCGA	15
treR-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCACCTTCATTATGGACCAC	16
treR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACCGTCTCGACAAATTCG	17
treR-BR	GTTGCCAAGCGCGATATAGG	18
yvbA-AF	TATACAGGGATTATCAGTATTGAGC	19
yvbA-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCCTTTCTCCTTGTGGATCTG	20
yvbA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGGGATAACGATTTATGAAG	21
yvbA-BR	TTTTGTAATAATGATATGAAGCTAGTGTG	22
cspB-AF	ATATCCAGCCCTGCCTCTTC	23
cspB-A/CmR	CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCGAAATTCCTCCTAA AGCGATCATAACG	24
cspB-B/CmF	GTCGTTTTACAACGTCGTTGACTGGGAAAACCCACAAGCTGCTAA CGTTAC	25
cspB-BR	TCCTGTTTGGGCTCCTGTTG	26
yvaN-AF	TGTTTATGTATGGCGGCCCTGCCGGAC	27
yvaN-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCAGCTTTCCATATATCTCACC	28
yvaN-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACGGTCTGCTGATGACTGAC	29
yvaN-BR	GCGTTTACTTAAGATGTCTGA	30
yttP-AF	TTTCTAGCGTTTCGGCAAATTGAGTTAAG	31
yttP-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCCTTACTTTTCATACGGCTCAC	32
yttP-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGAGACGTGGCGCTCACCAC	33
yttP-BR	CGGATTAATAAAGAATATCGCGGACAGC	34
yurK-AF	TGCCGCTGCCCCGCCGAGAG	35

【0040】

【表2-2】

yurK-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCAAGGTGTAGAACTTCCGTTG	36
yurK-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACCATCAACAGCCCCTACAC	37
yurK-BR	TCAAATAAAGGCGGCATTTCAGTCC	38
yoza-AF	ATAATGGTATCCAAATCCACGC	39
yoza-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCATTTCAGTCATATGTATCACC	40
yoza-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGATCCATCATAACAGCATG	41
yoza-BR	CACCTCTCAACGGAGGGGATTTTCACATC	42
licR-AF	TAATGGAGGAGAGAAGGCCG	43
licR-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCAGTCGCCCATGAAGCATGAG	44
licR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACCAAAAAATGCTGAGCTGACAGC	45
licR-BR	TTGCCAATGATGAGGAAAAAGGAACC	46
sigL-AF	CTGAACGTCTTGAATAAAAAAGCAGG	47
sigL-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGCTGAAGTTTCATATCCATC	48
sigL-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACATTCCGTCATCGGCAGCGAG	49
sigL-BR	AGCGGTTTACAAGTTGGAGG	50
mntR-AF	ATTCAGAAGGCATACTTCAAG	51
mntR-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCATACTTGGTGTTGTCATCG	52
mntR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACATAATCAGTAAAAAGGCGGTC	53
mntR-BR	TTCTGACCGCTCTGGCAACC	54
glcT-AF	ATAATGCCCGCTTCCCAACC	55
glcT-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGATCCTCAGCTCCTTTGTC	56
glcT-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCTCATCTGATACCGATTAAACC	57
glcT-BR	CAACTGAATCCGAAGGAATG	58
yvdE-AF	TCGGGGTCATGCCGAGCGGT	59
yvdE-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGAATGTTGCCATTTTCATCC	60
yvdE-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCTGTACGAGAATCAACGCTG	61
yvdE-BR	CACGGCAATGCATTCTTCGG	62
ykvE-AF	AGATCTGTGCGCCAGGTTTAC	63
ykvE-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGATTTTCTGTCATGTCTC	64
ykvE-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGGTAGAGATGTGCACCGAAA	65
ykvE-BR	GAGTCAGACGGCATCGATGA	66
slr-AF	TTCTGATTCATTTTCACTGCTGG	67
slr-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCACGGATAATTCTTCCAATC	68
slr-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGTCCATGAAGTCAAATCC	69
slr-BR	CGCTGAAATATTCTCTCGCA	70
rocR-AF	CGCCGCTTTACCGCGGATTC	71
rocR-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCCTTTGACCACTGTATGAACC	72

【0041】

【表 2-3】

rocR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACTCGTCTAACGAATAATCC	73
rocR-BR	TGTCATCACGGAATTTGACG	74
ccpA-AF	CCAAATTATCCTTTGTGAGCGCGGAATCAG	75
ccpA-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGCTAGATCGTAATATTGCTC	76
ccpA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAAACAGCTTAGAAAGTCAACCAAG	77
ccpA-BR	TTTGAGCATCAGCACAAGCC	78
yaaT-AF	TGTAGCAGAAGCAGTCGAATT	79
yaaT-A/Cm2R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGACAATTACGCAGCTGTCATGT	80
yaaT-B/Cm2F	CTGCCCCGTTAGTTGAAGAACTGATAAACCGTGAAAAAGTG	81
yaaT-RV	CCTTTGAAAAAGGCTCCCGT	82
yyaA-AF	GTTTTCCAAGTCTGCCGATAAAAAATATGC	83
yyaA-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCATGCTTCATGTACCTACACC	84
yyaA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCAATTAACGATTCGCATACC	85
yyaA-BR	AAAAAGAAGAAGTCACAGTACAGAACGTGG	86
yycH-AF	ATTTTTCGCCATCTTGAATTTTC	87
yycH-A/Cm2R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGGATGATCCTCTCGTTGAACTG	88
yycH-B/Cm2F	CTGCCCCGTTAGTTGAAGGGATGAGCCTTCAGAAAAGTT	89
yycH-BR	GCCGGACAGAGATCTGTATG	90
yacP-B/Cm4F	GAAGAAGGTTTTATGTTGACGCTTTTTTGCCCAATACTGTATAA	91
yacP-B/Cm4R	CAAAAAAGCGTCAACATAAAACCTTCTTCAACTAACGGGGCAGG	92
yacP-BR	AAGACGAGTACTTTTCTCTCTAAATCACTT	93
yacP-AF	AACTCGATCAAATGGTGACAGGACAGCATC	94
yacP-A/Cm4F	GGAGAATAAAGACCCTCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	95
yacP-A/Cm4R	TGCTTTAGTTGAAGAGGTCTTTATTCTCCACAGGGTTTCGTTT	96
hprK-B/Cm4F	TTTTTATATTACAGCGAGTTGGCGTTAAATGAATGAAGCGATAGA	97
hprK-B/Cm4R	ATTTAACGCCAACTCGCTGTAATATAAAACCTTCTTCAACTAAC	98
hprK-BR	TTGATTGATGATAAATTCAGGCAGGTGCAG	99
hprK-AF	CAAAGCTTGAGAAATGTTCCCATGCTCTTG	100
hprK-A/Cm4F	CAGGAGGAACATATCTCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	101
hprK-A/Cm4R	TGCTTTAGTTGAAGAGATATGTTCTCCTGTTCCGGGCTGCCCCG	102
rsiX-AF	ATTCCAGTTACTCGTAATATAGTTG	103
rsiX-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCATTCATCCATTAGCTC	104
rsiX-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCTGCTCCAAATCCGATTTC	105
rsiX-BR	GTCCTGCATTTTTTGAAGTCTGG	106
yhdK-AF	TACACATCCTTCAAACAAGTCTGAACAAAC	107

【0042】

【表 2-4】

yhdK-A/Cm4R	TGCTTTAGTTGAAGATTACCAGTTCCATAATTCCACCTCGCCGAC	108
yhdK-B/Cm4F	TTTTTATATTACAGCGTGTGTATACCATTGTATCTGTAGATACGA	109
yhdK-BR	GCTATGATCATTGTAACGAAAGGAAAGGGG	110
yhdK-A/Cm4F	TTATGGAACTGGTAATCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	111
yhdK-B/Cm4R	CAATGGTATACACACGCTGTAATATAAAAAACCTTCTTCAACTAAC	112
y1b0-AF	AATCTGAACAAGAAAAAGGAGCTGCTCCTC	113
y1b0-A/Cm4R	TGCTTTAGTTGAAGAATTCAATCTCCCTCCATGTCAGCTTATTTA	114
y1b0-B/Cm4F	TTTTTATATTACAGCAGAAACGCTGAAATGAACCGGCCCTATAG	115
y1b0-BR	TGTTTGACAAAGGTAGAACGCTGCTTATC	116
y1b0-A/Cm4F	GGAGGGAGATTGAATTCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	117
y1b0-B/Cm4R	ATTTTCAGGCGTTTCTGCTGTAATATAAAAAACCTTCTTCAACTAAC	118
CmF	GAATTGTGAGCGGATAAC	119
CmR	GTTTTCCAGTCACGACG	120
Cm2F	CAACTAAAGCACCCATTAG	121
Cm2R	CTTCAACTAACGGGGCAG	122

## 【0043】

## 実施例 2

一方、実施例 1 と同様に、表 2 に示した各遺伝子-AF、各遺伝子-A/CmR、各遺伝子-B/CmF、各遺伝子-BR、CmF、CmR のプライマーセットにより調製した削除用 DNA 断片を用いて、ゲノム上の comA、yopQ、treR、yvbA、yvaN、yttP、yurK、yoza、licR、sigL、mntR、glcT、ykvE、slr、rocR、yvaA、及び rsiX、遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した孢子形成遺伝子削除株をそれぞれ分離した。

## 【0044】

## 実施例 3

また、表 2 に示した各遺伝子-AF、各遺伝子-A/Cm2R、各遺伝子-B/Cm2F、各遺伝子-BR、Cm2F、Cm2R のプライマーセットにより、実施例 2 と同様に調製した削除用 DNA 断片を用いて、ゲノム上の cspB、yvdE、yaaT、yycH、及び y1b0、各遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した孢子形成遺伝子削除株をそれぞれ分離した。

## 【0045】

## 実施例 4

更に、表 2 に示した各遺伝子-AF、各遺伝子-A/Cm4R、各遺伝子-B/Cm4F、各遺伝子-BR、各遺伝子-A/Cm4F、各遺伝子-B/Cm4R のプライマーセットにより、実施例 2 と同様に調製した削除用 DNA 断片を用いて、ゲノム上の yacP、hprK、及び yhdK、各遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した孢子形成遺伝子削除株をそれぞれ分離した。

## 【0046】

## 実施例 5

実施例 1、2 にて得られた各遺伝子削除株、及び対照として枯草菌 168 株に、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-S237 株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子 (特開 2000-210081 号公報) をコードする DNA 断片 (3.1 kb) がシャトルベクター pHY300PLK の BamHI 制限酵素切断点に挿入された組換えプラスミド pHY-S237 を、プロトプラスト形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を 5 mL の LB 培地で一夜 30℃ で振盪培養を行い、更にこの培養液 0.03 mL を 30 mL の 2×L-マルトース培地 (2% トリプトン、1% 酵母エキス、1% NaCl、7.5% マルトース、7.5 ppm 硫酸マンガナ 4-5 水和物、15 ppm テトラサイクリン) に接種し、30℃ で 3 日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を

除いた培養液上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表3に示した様に、宿主として各遺伝子削除株を用いた場合、対照の168株（野生型）の場合と比較して高いアルカリセルラーゼの分泌生産が認められた。

【表3】

削除遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子サイズ (bp)	削除サイズ (bp)	アルカリセルラーゼ 分泌生産量 (相対値)
<i>comA</i>	BG10381	645	588	160
<i>yopO</i>	BG13648	213	169	154
<i>treR</i>	BG11011	717	656	139
<i>yvbA</i>	BG14078	273	210	137
<i>cspB</i>	BG10824	204	171	132
<i>yvaN</i>	BG14069	408	379	124
<i>yttP</i>	BG13927	624	590	121
<i>yurK</i>	BG13997	729	677	118
<i>yoza</i>	BG13748	324	289	117
<i>licR</i>	BG11346	1926	1889	116
<i>sigL</i>	BG10748	1311	1256	114
<i>mntR</i>	BG11702	429	399	114
<i>glcT</i>	BG12593	858	811	110
<i>yvdE</i>	BG12414	951	916	109
<i>ykvE</i>	BG13310	438	356	108
<i>slr</i>	BG11858	459	394	105
<i>rocR</i>	BG10723	1386	1359	128
<i>ccpA</i>	BG10376	1005	957	205
<i>yaaT</i>	BG10096	828	828	127
<i>yyaA</i>	BG10057	852	816	113
<i>yycH</i>	BG11462	1368	1368	146
<i>yacP</i>	BG10158	513	513	156
<i>hprK</i>	BG14125	933	933	196
<i>rsiX</i>	BG10537	1107	1068	125
<i>yhdK</i>	BG13017	291	228	114
<i>ylbO</i>	BG13367	582	582	136
なし (野生型)	—	—	—	100

## 【0047】

## 実施例 6

実施例1-4にて得られた各遺伝子削除株、及び対照として枯草菌168株に、パチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-K38株由来のアルカリアミラーゼ遺伝子（特開2000-184882号公報、Eur. J. Biochem., 268, 2974 (2001)）の成熟酵素領域（Asp1-Gln480）をコードするDNA断片（1.5 kb）の上流に配列番号3に示されるアルカリセルラーゼ遺伝子のプロモーター領域とシグナル配列領域の一部を含む上流側0.6 kb断片を結合して成る2.1 kb断片（配列番号5）をシャトルベクターpHY300PLKのBglII-XbaI制限酵素切断部位に挿入された組換えプラスミドpHSP-K38を、プロトプラスト形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を5 mLのLB培地で一夜30℃で振盪培養を行い、更にこの培養液0.6 mLを30 mLの2×L-マルトース培地（2%トリプトン、1%酵母エキス、1% NaClを30 mLの2×L-マルトース培地（2%トリプトン、1%酵母エキス、1% NaClを30 mLの2×L-マルトース、7.5 ppm硫酸マンガン4-5水和物、15 ppmテトラサ

イクリン) に接種し、30℃で3～6日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリアミラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリアミラーゼの量を求めた。この結果、表4に示した様に、各遺伝子削除株を宿主として用いた場合、対照の168株(野生型)の場合と比較して高いアルカリアミラーゼの分泌生産が認められた。

【0048】

【表4】

削除遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子サイズ (bp)	削除サイズ (bp)	アルカリアミラーゼ 分泌生産量(相対値)
培養3日間				
<i>Slr</i>	BG11858	459	394	178
<i>treR</i>	BG11011	717	656	124
<i>yopO</i>	BG13648	213	169	364
<i>yvaN</i>	BG14069	408	379	148
<i>yvba</i>	BG14078	273	210	171
なし(野生型)	—	—	—	100
培養5日間				
<i>cspB</i>	BG10824	204	171	195
<i>rocR</i>	BG10723	1386	1359	215
<i>sigL</i>	BG10748	1311	1256	204
<i>glcT</i>	BG12593	858	811	132
<i>yvdE</i>	BG12414	951	916	127
<i>yacP</i>	BG10158	513	513	110
なし(野生型)	—	—	—	100
培養6日間				
<i>yycH</i>	BG11462	1368	1368	120
<i>licR</i>	BG11346	1926	1889	122
なし(野生型)	—	—	—	100

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、SOE-PCRによる遺伝子削除用DNA断片の調製、及び当該DNA断片を用いて標的遺伝子を削除(薬剤耐性遺伝子と置換)する方法を模式的に示したものである。



【配列表】  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KAO CORPORATION

&lt;120&gt; Host microorganisms

&lt;130&gt; P05021511

&lt;160&gt; 122

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3150

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus sp. KSM-S237

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (573)..(3044)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (573)..(659)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (660)..()

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

gatttgccga tgcaacaggc ttatathtag aggaaatttc tttttaaaatt gaatacggaa 60  
taaaatcagg taaacaggtc ctgattttat ttttttgagt tttttagaga actgaagatt 120  
gaaataaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180  
gcctttttat aattatttat acctagaacg aaaatactgt ttcgaaagcg gtttactata 240  
aaaccttata ttccggctct tttttaaaac agggggtaaa aattcactct agtattctaa 300  
tttcaacatg ctataataaa tttgtaagac gcaatatgca tctctttttt tacgatatat 360  
gtaagcgggtt aaccttgtgc tatatgccga tttaggaagg ggggtagatt gagtcaagta 420  
gtaataatat agataactta taagttgttg agaagcagga gagcatctgg gttactcaca 480

agttttttta aaactttaac gaaagcactt tcggtaatgc ttatgaattt agctatttga 540  
 ttcaattact ttaaaaatat ttaggaggta at atg atg tta aga aag aaa aca 593  
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr  
 -25  
 aag cag ttg att tct tcc att ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta 641  
 Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu  
 -20 -15 -10  
 ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt 689  
 Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe  
 -5 -1 1 5 10  
 aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc 737  
 Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly  
 15 20 25  
 gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga caa atg aca tta gta gat caa 785  
 Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln  
 30 35 40  
 cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga atg agt aca cac gga tta cag 833  
 His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln  
 45 50 55  
 tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac gca tac aaa gct ctt tct aac 881  
 Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn  
 60 65 70  
 gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt gct atg tat gta ggt gaa aat 929  
 Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn  
 75 80 85 90  
 ggg tac gct aca aac cct gag tta atc aaa caa aga gtg att gat gga 977  
 Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly  
 95 100 105  
 att gag tta gcg att gaa aat gac atg tat gtt att gtt gac tgg cat 1025  
 Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His  
 110 115 120  
 gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat cct gtt tat gca ggt gct aaa 1073  
 Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys  
 125 130 135  
 gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta tac cct aat aat cca cac att 1121  
 Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile  
 140 145 150

att tat gag tta gcg aat gag ccg agt agt aat aat aat ggt gga gca 1169  
 Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala  
 155 160 165 170

ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg aaa gcg gta aaa gaa tat gct 1217  
 Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala  
 175 180 185

gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa agc ggt aat gca gat gac aac 1265  
 Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn  
 190 195 200

att atc att gtt ggt agt cca aac tgg agt cag cgt ccg gac tta gca 1313  
 Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala  
 205 210 215

gct gat aat cca att gat gat cac cat aca atg tat act gtt cac ttc 1361  
 Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe  
 220 225 230

tac act ggt tca cat gct gct tca act gaa agc tat ccg tct gaa act 1409  
 Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr  
 235 240 245 250

cct aac tct gaa aga gga aac gta atg agt aac act cgt tat gcg tta 1457  
 Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu  
 255 260 265

gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca gag tgg gga acg agt caa gct 1505  
 Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala  
 270 275 280

agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat gaa gca gat gta tgg att gaa 1553  
 Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu  
 285 290 295

ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat 1601  
 Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn  
 300 305 310

aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct 1649  
 Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser  
 315 320 325 330

aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca gat cat gtg tgg gca cca gaa 1697  
 Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu  
 335 340 345

gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg 1745  
 Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val

350	355	360	
aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac			1793
Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp			
365	370	375	
ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt gga gtg aat tcg gat tct cca			1841
Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro			
380	385	390	
aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat gaa aac aac act ttg aaa gtt			1889
Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val			
395	400	405	410
tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt tca gat ggc aac ttc tgg gct			1937
Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala			
415	420	425	
aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg gga aaa agt gtt gat att tta			1985
Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu			
430	435	440	
ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt att gtt gat gaa cca acg acg			2033
Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr			
445	450	455	
gta gct att gcg gcg att cca caa agt agt aaa agt gga tgg gca aat			2081
Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn			
460	465	470	
cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg gaa gat ttt gtc cag caa acg			2129
Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr			
475	480	485	490
gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca att aca gga gaa gat gct cct			2177
Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro			
495	500	505	
aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa gaa gat aac aat atg aac aac			2225
Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn			
510	515	520	
atc att ctg ttc gtg gga act gat gca gct gac gtt att tac tta gat			2273
Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp			
525	530	535	
aac att aaa gta att gga aca gaa gtt gaa att cca gtt gtt cat gat			2321
Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp			
540	545	550	

cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct gtt ttt gaa gac ggt aca cgt Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg 555 560 565 570	2369
caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct ggt gtg aaa aca gct tta aca Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr 575 580 585	2417
att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg tta tca tgg gaa ttt gga tat Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr 590 595 600	2465
cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg gca aca gct cca cgt tta gat Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp 605 610 615	2513
ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt gag aat gat tat gta gct ttt Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe 620 625 630	2561
gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile 635 640 645 650	2609
aat tta gta ttc cag cca cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro 655 660 665	2657
aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val 670 675 680	2705
aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa att aac gta aga gat att aca Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr 685 690 695	2753
aac att caa gat gac acg tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala 700 705 710	2801
gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg 715 720 725 730	2849
ttt gag ggg gct gct act act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp 735 740 745	2897
cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat gag aag gaa gcg aaa aaa gaa Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu	2945

750

755

760

caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa gaa gca gta aaa gaa gaa aag 2993  
 Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys  
           765                              770                              775

aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca gtc aaa aat gag gct aag aaa 3041  
 Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys  
           780                              785                              790

aaa taatctatta aactagttat agggttatct aaaggtctga tgtagatctt 3094  
 Lys  
 795

ttagataacc tttttcttgc ataactggac acagagttgt tattaaagaa agtaag 3150

<210> 2  
 <211> 824  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus sp. KSM-S237

<400> 2

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile  
                               -25                              -20                              -15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly  
                               -10                              -5                              -1 1

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val  
           5                              10                              15

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly  
 20                              25                              30                              35

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly  
                               40                              45                              50

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn  
                               55                              60                              65

Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu  
           70                              75                              80

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile  
85 90 95

Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met  
100 105 110 115

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp  
120 125 130

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu  
135 140 145

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser  
150 155 160

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp  
165 170 175

Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys  
180 185 190 195

Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp  
200 205 210

Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His  
215 220 225

Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr  
230 235 240

Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met  
245 250 255

Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr  
260 265 270 275

Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp  
280 285 290

Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp  
295 300 305

Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr  
310 315 320

Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro  
325 330 335

Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val  
340 345 350 355

Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys  
360 365 370

Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe  
375 380 385

Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn  
390 395 400

Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val  
405 410 415

Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp  
420 425 430 435

Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val  
440 445 450

Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser  
455 460 465

Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala  
470 475 480



Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr  
485 490 495

Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu  
500 505 510 515

Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala  
520 525 530

Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val  
535 540 545

Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser  
550 555 560

Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser  
565 570 575

Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala  
580 585 590 595

Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp  
600 605 610

Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly  
615 620 625

Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala  
630 635 640

Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn  
645 650 655

Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu  
660 665 670 675

Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys  
680 685 690

Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg  
695 700 705

Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg  
710 715 720

Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro  
725 730 735

Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp  
740 745 750 755

Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys  
760 765 770

Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala  
775 780 785

Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys  
790 795

<210> 3  
<211> 3332  
<212> DNA  
<213> Bacillus sp. KSM-64

<220>  
<221> CDS  
<222> (610)..(3075)  
<223>

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (610)..(696)  
<223>

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (697)..()

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

agtacttacc atttttagagt ~~aaaaagatag~~ aagccaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60  
 cttatattta gaggggaattt ctttttaaata tgaatacgga ataaaatcag gtaaacaggt 120  
 cctgatttta tttttttgaa tttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180  
 acggacataa gaaaattgta ttagttttta ttatagaaaa cgctttttcta taattattta 240  
 tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc ggtttactat aaaaccttat attccggctc 300  
 tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360  
 atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt tatgatattt gtaagcgggt aacctgtgtc 420  
 tatatgccga tttaggaagg gggtagattg agtcaagtag tcataattta gataacttat 480  
 aagttgttga gaagcaggag agaactctggg ttactcacia gttttttaaa acattatcga 540  
 aagcactttc ggttatgctt atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600  
 ggaggtaat atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att 651  
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile  
 -25 -20  
 ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg aca gct ctt gca gca 699  
 Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala  
 -15 -10 -5 -1 1  
 gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac 747  
 Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp  
 5 10 15  
 aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc 795  
 Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val  
 20 25 30  
 gat gga caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta 843  
 Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu  
 35 40 45  
 cgt gga atg agt aca cac gga tta caa tgg ttt cct gag atc ttg aat 891  
 Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn  
 50 55 60 65  
 gat aac gca tac aaa gct ctt gct aac gat tgg gaa tca aat atg att 939  
 Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile  
 70 75 80

cgt cta gct atg tat gtc ggt gaa aat ggc tat gct tca aat cca gag 987  
 Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu  
 85 90 95

tta att aaa agc aga gtc att aaa gga ata gat ctt gct att gaa aat 1035  
 Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn  
 100 105 110

gac atg tat gtc atc gtt gat tgg cat gta cat gca cct ggt gat cct 1083  
 Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro  
 115 120 125

aga gat ccc gtt tac gct gga gca gaa gat ttc ttt aga gat att gca 1131  
 Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala  
 130 135 140 145

gca tta tat cct aac aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag 1179  
 Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu  
 150 155 160

cca agt agt aac aat aat ggt gga gct ggg att cca aat aat gaa gaa 1227  
 Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu  
 165 170 175

ggt tgg aat gcg gta aaa gaa tac gct gat cca att gta gaa atg tta 1275  
 Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu  
 180 185 190

cgt gat agc ggg aac gca gat gac aat att atc att gtg ggt agt cca 1323  
 Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro  
 195 200 205

aac tgg agt cag cgt cct gac tta gca gct gat aat cca att gat gat 1371  
 Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp  
 210 215 220 225

cac cat aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct 1419  
 His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala  
 230 235 240

tca act gaa agc tat ccg cct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac 1467  
 Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn  
 245 250 255

gta atg agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gca gta ttt 1515  
 Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe  
 260 265 270

gca aca gag tgg gga act agc caa gca aat gga gat ggt ggt cct tac 1563

Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr	
275 280 285	
ttt gat gaa gca gat gta tgg att gag ttt tta aat gaa aac aac att	1611
Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile	
290 295 300 305	
agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca	1659
Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala	
310 315 320	
ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca aca agt ctt gac cca	1707
Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro	
325 330 335	
ggg cca gac caa gta tgg gta cca gaa gag tta agt ctt tct gga gaa	1755
Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu	
340 345 350	
tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt	1803
Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg	
355 360 365	
aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa	1851
Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln	
370 375 380 385	
gga ttt gga gtg aat gga gat tct cca gtt gaa gat gta gtt att gag	1899
Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu	
390 395 400	
aat gaa gcg ggc gct tta aaa ctt tca gga tta gat gca agt aat gat	1947
Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp	
405 410 415	
gtt tct gaa ggt aat tac tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc gac ggt	1995
Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly	
420 425 430	
tgg gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gaa aaa ctt act atg gat	2043
Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp	
435 440 445	
gtg att gtt gat gag ccg acc acg gta tca att gct gca att cca caa	2091
Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln	
450 455 460 465	
ggg cca tca gcc aat tgg gtt aat cca aat cgt gca att aag gtt gag	2139
Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu	
470 475 480	

cca act aat ttc gta ccg tta gga gat aag ttt aaa gcg gaa tta act 2187  
 Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr  
 485 490 495

ata act tca gct gac tct cca tcg tta gaa gct att gcg atg cat gct 2235  
 Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala  
 500 505 510

gaa aat aac aac atc aac aac atc att ctt ttt gta gga act gaa ggt 2283  
 Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly  
 515 520 525

gct gat gtt atc tat tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt 2331  
 Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val  
 530 535 540 545

gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct 2379  
 Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser  
 550 555 560

gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct 2427  
 Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser  
 565 570 575

ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg 2475  
 Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala  
 580 585 590

tta tca tgg gaa ttt gga tac cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg 2523  
 Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp  
 595 600 605

gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt 2571  
 Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly  
 610 615 620 625

gaa aat gat tat gta act ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca 2619  
 Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala  
 630 635 640

aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac 2667  
 Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn  
 645 650 655

ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa 2715  
 Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu  
 660 665 670

tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa 2763

Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys  
 675 680 685

att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt 2811  
 Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg  
 690 695 700 705

aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga 2859  
 Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg  
 710 715 720

gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg 2907  
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro  
 725 730 735

gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg ccg cct gtc gat 2955  
 Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp  
 740 745 750

gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa 3003  
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys  
 755 760 765

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 3051  
 Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala  
 770 775 780 785

atc aaa aat gag gct acg aaa aaa taatctaata aactagttat agggttatct 3105  
 Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys  
 790

aaaggctctga tgcagatctt ttagataacc tttttttgca taactggaca tagaatggtt 3165

attaaagaaa gcaaggtgtt tatacgatat taaaaaggta gcgattttta attgaaacct 3225

ttaataatgt cttgtgatag aatgatgaag taatttaaga gggggaaacg aagtgaaaac 3285

ggaaatttct agtagaagaa aaacagacca agaaatactg caagctt 3332

<210> 4

<211> 822

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-64

<400> 4

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile  
 -25 -20 -15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala Glu Gly  
-10 -5 -1 1

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val  
5 10 15

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly  
20 25 30 35

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly  
40 45 50

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn  
55 60 65

Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile Arg Leu  
70 75 80

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu Leu Ile  
85 90 95

Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met  
100 105 110 115

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp  
120 125 130

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala Ala Leu  
135 140 145

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser  
150 155 160

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp  
165 170 175

Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Asp



180                      185                      190                      195  
 Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp  
                                  200                                   205                                   210  
 Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His  
                                  215                                   220                                   225  
 Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr  
                                  230                                   235                                   240  
 Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met  
                                  245                                   250                                   255  
 Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr  
                                  260                                   265                                   270                                   275  
 Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp  
                                  280                                   285                                   290  
 Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp  
                                  295                                   300                                   305  
 Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr  
                                  310                                   315                                   320  
 Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro Gly Pro  
                                  325                                   330                                   335  
 Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val  
                                  340                                   345                                   350                                   355  
 Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys  
                                  360                                   365                                   370  
 Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe  
                                  375                                   380                                   385

Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu Asn Glu  
390 395 400

Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp Val Ser  
405 410 415

Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly Trp Gly  
420 425 430 435

Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile  
440 445 450

Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln Gly Pro  
455 460 465

Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu Pro Thr  
470 475 480

Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr Ile Thr  
485 490 495

Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala Glu Asn  
500 505 510 515

Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly Ala Asp  
520 525 530

Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile  
535 540 545

Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe  
550 555 560

Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val  
565 570 575

Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser

580                      585                      590                      595  
 Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr  
                                 600                      605                      610  
 Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn  
                                 615                      620                      625  
 Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu  
                                 630                      635                      640  
 Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr  
                                 645                      650                      655  
 Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu  
                                 660                      665                      670                      675  
 Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn  
                                 680                      685                      690  
 Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met  
                                 695                      700                      705  
 Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe  
                                 710                      715                      720  
 Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu  
                                 725                      730                      735  
 Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys  
                                 740                      745                      750                      755  
 Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala  
                                 760                      765                      770  
 Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Ile Lys  
                                 775                      780                      785

Asn Glu Ala Thr Lys Lys  
790

<210> 5  
<211> 2343  
<212> DNA  
<213> Bacillus sp.pHSP-K38

<220>  
<221> CDS  
<222> (580).. (2067)  
<223>

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (580).. (627)  
<223>

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (628).. ()  
<223>

<400> 5  
agatctagca ggatttgccg atgcaaccgg cttatatatta gaggggaattt ctttttaaat 60  
tgaatacggga ataaaatcag gtaaacaggt cctgatttta tttttttgaa tttttttgag 120  
aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca acggacataa gaaaattgta ttagttttaa 180  
ttatagaaaa cgcttttcta taattattta tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc 240  
ggtttactat aaaaccttat attccggctc tttttttaaa caggggggtga aaattcactc 300  
tagtattcta atttcaacat gctataataa atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt 360  
tatgatattt gtaagcgggt aacctgtgc tatatgccga tttaggaagg gggtagattg 420  
agtcaagtag tcataattta gataacttat aagttgttga gaagcaggag agaatctggg 480  
ttactcacia gttttttaaa acattatcga aagcactttc ggttatgctt atgaatttag 540  
ctatttgatt caattacttt aataatttta ggaggtaat atg atg tta aga aag 594  
Met Met Leu Arg Lys

-15

aaa aca aag cag ttg ggt cga cca gca caa gcc gat gga ttg aac ggt 642  
Lys Thr Lys Gln Leu Gly Arg Pro Ala Gln Ala Asp Gly Leu Asn Gly

1	-10	-5	-1	1	5	
acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa aac gac ggg cag cat						690
Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His						
	10		15		20	
tgg aat cgg ttg cac gat gat gcc gca gct ttg agt gat gct ggt att						738
Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ala Gly Ile						
	25		30		35	
aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt aat agt cag gcg gat						786
Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp						
	40		45		50	
gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta gga gag ttc aat caa						834
Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln						
	55		60		65	
aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag gca cag ctt gaa cga						882
Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg						
	70		75		80	
gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat gta tac gga gat gtc						930
Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val						
	90		95		100	
gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg gag gca gtg caa gct						978
Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala						
	105		110		115	
gtt caa gta aat cca acg aat cgt tgg cag gat att tca ggt gcc tac						1026
Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Ala Tyr						
	120		125		130	
acg att gat gcg tgg acg ggt ttc gac ttt tca ggg cgt aac aac gcc						1074
Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser Gly Arg Asn Asn Ala						
	135		140		145	
tat tca gat ttt aag tgg aga tgg ttc cat ttt aat ggt gtt gac tgg						1122
Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp						
	150		155		160	
gat cag cgc tat caa gaa aat cat att ttc cgc ttt gca aat acg aac						1170
Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn						
	170		175		180	
tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aac ggt aat tat gat tac ctg tta						1218
Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu						
	185		190		195	

gga tcg aat atc gac ttt agt cat cca gaa gta caa gat gag ttg aag 1266  
 Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val Gln Asp Glu Leu Lys  
 200 205 210

gat tgg ggt agc tgg ttt acc gat gag tta gat ttg gat ggt tat cgt 1314  
 Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg  
 215 220 225

tta gat gct att aaa cat att cca ttc tgg tat aca tct gat tgg gtt 1362  
 Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val  
 230 235 240 245

cgg cat cag cgc aac gaa gca gat caa gat tta ttt gtc gta ggg gaa 1410  
 Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu  
 250 255 260

tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt tat tta gat gaa atg 1458  
 Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met  
 265 270 275

aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt cca ctt aat tat aat ttt tac 1506  
 Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr  
 280 285 290

cgg gct tca caa caa ggt gga agc tat gat atg cgt aat att tta cga 1554  
 Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg  
 295 300 305

gga tct tta gta gaa gcg cat ccg atg cat gca gtt acg ttt gtt gat 1602  
 Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp  
 310 315 320 325

aat cat gat act cag cca ggg gag tca tta gag tca tgg gtt gct gat 1650  
 Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp  
 330 335 340

tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca att ttg acg cgt gaa ggt ggt 1698  
 Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly  
 345 350 355

tat cca aat gta ttt tac ggt gat tac tat ggg att cct aac gat aac 1746  
 Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn  
 360 365 370

att tca gct aaa aaa gat atg att gat gag ctg ctt gat gca cgt caa 1794  
 Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln  
 375 380 385

aat tac gca tat ggc acg cag cat gac tat ttt gat cat tgg gat gtt 1842  
 Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Val

390		395		400		405	
gta gga tgg act agg gaa gga tct tcc tcc aga cct aat tca ggc ctt	1890						
Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu							
		410		415		420	
gcg act att atg tcg aat gga cct ggt ggt tcc aag tgg atg tat gta	1938						
Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val							
		425		430		435	
gga cgt cag aat gca gga caa aca tgg aca gat tta act ggt aat aac	1986						
Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn Asn							
		440		445		450	
gga gcg tcc gtt aca att aat ggc gat gga tgg ggc gaa ttc ttt acg	2034						
Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr							
		455		460		465	
aat gga gga tct gta tcc gtg tac gtg aac caa taacaaaaag ccttgagaag	2087						
Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln							
		470		475		480	
ggattcctcc ctaactcaag gctttcttta tgtcgcttag ctttacgctt ctacgacttt	2147						
gaagcttggg gatccgtcga gacaaggtaa aggataaaac agcacaattc caagaaaaac	2207						
acgatttaga acataaaaag aacgaatttg aactaactca taaccgagag gtaaaaaaag	2267						
aacgaagtcg agatcaggga atgagtttat aaaataaaaa aagcacctga aaaggtgtct	2327						
ttttttgatg tctaga	2343						

<210> 6  
<211> 496  
<212> PRT  
<213> Bacillus sp.pHSP-K38

<400> 6

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Gly Arg Pro Ala Gln Ala  
-15 -10 -5 -1

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu  
1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu  
20 25 30

Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
35 40 45

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
65 70 75 80

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn  
85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr  
100 105 110

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp  
115 120 125

Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser  
130 135 140

Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe  
145 150 155 160

Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg  
165 170 175

Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn  
180 185 190

Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val  
195 200 205

Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp  
210 215 220



Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr  
225 230 235 240

Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu  
245 250 255

Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe  
260 265 270

Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu  
275 280 285

Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met  
290 295 300

Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala  
305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu  
325 330 335

Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu  
340 345 350

Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly  
355 360 365

Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu  
370 375 380

Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe  
385 390 395 400

Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg  
405 410 415

Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser  
420 425 430

Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
435 440 445

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
450 455 460

Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
465 470 475 480

<210> 7  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 7  
aagatgata atccgtcccg tg 22

<210> 8  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 8  
gttatccgct cacaattcgg atggtcatca atcactag 38

<210> 9  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 9  
cgctcgtgact gggaaaactg cgaaatcaga cggtgtac 38

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 10  
cgtcgcctat cggcgggcac 20

<210> 11

<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 11  
atgtatatag gaggttggtg gtatg 25

<210> 12  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 12  
ggtatccgct cacaattcgc tctgacatgt caacctcc 38

<210> 13  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 13  
cgctcgtgact gggaaaacag atgagaaagg aggagaag 38

<210> 14  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 14  
ataactgtta ctatataatg gcc 23

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 15  
gctggggatg acgaatccga 20

<210> 16  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 16

1 gttatccgct cacaattctc accttcatta tggaccac 38

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

cgctcgtgact gggaaaacca ccgtctcgaca aattccg 38

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

gttgccaagc gcgatatagg 20

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

tatacaggga ttatcagtat tgagc 25

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gttatccgct cacaattctt ttctccttgt tggatctg 38

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

cgctcgtgact gggaaaacgg ggataacgat ttatgaag 38

<210> 22

<211> 30

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 22  
ttttgtaata atgatatgaa gctagtgttg 30

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 23  
atatccagcc ctgcctcttc 20

<210> 24  
<211> 58  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 24  
ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc gaaatttcct cctaaagcga tcataacg 58

<210> 25  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 25  
gtcgtttttac aacgtcgttg actgggaaaa cccacaagct gctaacgtta c 51

<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 26  
tcctgtttgg gctcctgttg 20

<210> 27  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 27  
tgtttatgta tggcggcctg cgggac 26

<210> 28  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 28  
gttatccgct cacaattcag cttccatat atctcacc 38

<210> 29  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 29  
cgtcgtgact gggaaaacac ggtctgctga tgactgac 38

<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 30  
gcgtttactt aagatgtcga 20

<210> 31  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 31  
tttctagcgt ttcggcaaatt gagttaag 39

<210> 32  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 32  
gttatccgct cacaattcct tactttcata cggctcac 38

<210> 33  
<211> 38  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

cgtcgtgact gggaaaacga gacgtggcgc tcaccaac 38

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

cggattaaaa aaagaatatt gcggacagc 29

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

tgccgctgcc cgccggagag 20

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

gttatccgct cacaattcaa ggtgtagaac ttccgttg 38

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

cgtcgtgact gggaaaacac catcaacagc ccctacac 38

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

tcaaataaag gcggcattca gtcc 24

<210> 39  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 39  
ataatggtat ccaaattccac gc 22

<210> 40  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 40  
gttatccgct cacaattcat tcagtcatat gtatcacc 38

<210> 41  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 41  
cgtcgtgact gggaaaacga tccatcatac acagcatg 38

<210> 42  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 42  
cacttctcaa cggaggggat ttcacatc 28

<210> 43  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 43  
taatggagga gagaaggccg 20

<210> 44  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence



<400> 44  
gttatccgct cacaattcag tgccccatga agcatgag 38

<210> 45  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 45  
cgtcgtgact gggaaaacac caaaaaatgc tgagctgaca gc 42

<210> 46  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 46  
ttgccaatga tgaggaaaaa ggaacc 26

<210> 47  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 47  
ctgaacgtcttgaataaaaaagcagg 26

<210> 48  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 48  
gttatccgct cacaattcgc tgaagtttca tatccatc 38

<210> 49  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 49  
cgtcgtgact gggaaaacat tccgtcatcg gcagcgag 38

<210> 50  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 50  
agcggtttac aagttggagg 20

<210> 51  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 51  
atttcagaag gcatacttca ag 22

<210> 52  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 52  
gttatccgct cacaattcca tacttggtgt tgtcatcg 38

<210> 53  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 53  
cgtcgtgact gggaaaacca taatcagtaa aaaggcggtc 40

<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 54  
ttctgaccgc tctggcaacc 20

<210> 55  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 55  
ataatgcccg cttcccaacc 20

<210> 56  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 56  
gttatccgct cacaattccg atcctcagct cctttgtc 38

<210> 57  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 57  
cgtcgtgact gggaaaactc atctgatacc gattaacc 38

<210> 58  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 58  
caactgaatc cgaaggaatg 20

<210> 59  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 59  
tcgggggtcat gccgagcggc 20

<210> 60  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 60  
gttatccgct cacaattcca atgttgccat tttcatcc 38

<210> 61

<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 61  
cgctcgtgact gggaaaactt gtacgagaat caacgctg 38

<210> 62  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 62  
cacggcaatg cattcttcgg 20

<210> 63  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 63  
agatctgtcg gccaggttta c 20

<210> 64  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 64  
ggtatccgct cacaattctg atttttctgt catgtctc 61

<210> 65  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 65  
cgctcgtgact gggaaaacgg tagagatgtg caccgaaa 38

<210> 66  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 66

gagtcagacg gcatcgatga 20

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 67

ttctgattca ttttactgc tgg 23

<210> 68

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 68

ggtatccgct cacaattcaa cggataattc ttccaatc 38

<210> 69

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 69

cgctcgtgact gggaaaactg tccatgaagt caaatcc 37

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 70

cgctgaaata ttctctcgca 20

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 71

cgccgctttc accgcggatt c 21

<210> 72

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 72

gttatccgct cacaattcct ttgaccactg tatgaacc 38

<210> 73

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 73

cgtcgtgact gggaaaacac tcgtctaacg aataatcc 38

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 74

tgtcatcacg gaatttgacg 20

<210> 75

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 75

ccaaattatc ctttgtgagc gcggaatcag 30

<210> 76

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 76

gttatccgct cacaattccg tagatcgtaa tattgctc 38

<210> 77

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 77

cgtcgtgact gggaaaacag cttagaaagt caaccaag 38

<210> 78  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 78  
tttgagcatc agcacaagcc 20

<210> 79  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 79  
tgtagcagaa gcagtcgaat t 21

<210> 80  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 80  
ctaattgggtg ctttagttga caattacgca gctgtcatgt 40

<210> 81  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 81  
ctgccccgtt agttgaagaa ctgataaacc gtgaaaaagt g 41

<210> 82  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 82  
cctttgaaaa aggctcccgt 20

<210> 83  
<211> 29  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 83

gtttccaag tctgccgata aaaatatgc 29

<210> 84

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 84

gttatccgct cacaattcat gttcatgta cctacacc 38

<210> 85

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 85

cgtcgtgact gggaaaacca attaacgatt cgcatacc 38

<210> 86

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 86

aaaaagaaga agtcacagta cagaacgtgg 30

<210> 87

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 87

atttttcgcc atcttgaatt ttc 23

<210> 88

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 88

ctaattgggtg ctttagttgg atgatcctct cgttgaactg 40



<210> 89  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 89  
ctgccccgtt agttgaaggg atgagccttc agaaaagtt 39

<210> 90  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 90  
gccggacaga gatctgtatg 20

<210> 91  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 91  
gaagaagggtt tttatgttga cgcttttttg cccaatactg tataa 45

<210> 92  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 92  
caaaaaagcg tcaacataaa aaccttcttc aactaacggg gcagg 45

<210> 93  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 93  
aagacgagta cttttctctc taaatcactt 30

<210> 94  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 94  
aactcgatca aatggtgaca ggacagcatc 30

<210> 95  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 95  
ggagaataaaa gaccctcttc aactaaagca cccattagtt caaca 45

<210> 96  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 96  
tgcttttagtt gaagagggtc tttattctcc cacagggttt cgttt 45

<210> 97  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 97  
tttttatatt acagcgagtt ggcgttaaatt gaatgaagcg ataga 45

<210> 98  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 98  
atttaacgcc aactcgctgt aatataaaaa ccttcttcaa ctaac 45

<210> 99  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 99  
ttgattgatg ataaattcag gcaggtgcag 30

<210> 100  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 100  
caaagcttga gaaatgttcc catgctcttg 30

<210> 101  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 101  
caggaggaac atatctcttc aactaaagca cccattagtt caaca 45

<210> 102  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 102  
tgctttagtt gaagagatat gttcctcctg ttccgggctg ccccg 45

<210> 103  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 103  
attccagtta ctcgtaatat agttg 25

<210> 104  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 104  
gttatccgct cacaattcac ttcatcatcc attagctc 38

<210> 105  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 105  
cgctcgtgact gggaaaacct gctccaaatc cgatttcc 38

<210> 106  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 106  
gtcctgcatt tttcgaagtc tgg 23

<210> 107  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 107  
tacacatcct tcaaacaagt ctgaacaaac 30

<210> 108  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 108  
tgctttagtt gaagattacc agttccataa ttccacctcg ccgac 45

<210> 109  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 109  
tttttatatt acagcgtgtg tataccattg tatctgtaga tacga 45

<210> 110  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 110  
gctatgatca ttgtaacgaa aggaaagggg 30

<210> 111

<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 111  
ttatggaact ggtaatcttc aactaaagca cccattagtt caaca 45

<210> 112  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 112  
caatggtata cacacgctgt aatataaaaa ccttcttcaa ctaac 45

<210> 113  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 113  
aatctgaaca agaaaaagga gctgctcctc 30

<210> 114  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 114  
tgcttttagtt gaagaattca atctccctcc atgtcagctt attta 45

<210> 115  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 115  
tttttatatt acagcagaaa cgcctgaaat gaaccggccc tatag 45

<210> 116  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 116

tgtttgacaa aggtagaacg tctgcttatc 30

<210> 117

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 117

ggagggagat tgaattcttc aactaaagca cccattagtt caaca 45

<210> 118

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 118

atttcaggcg tttctgctgt aatataaaaa cttcttcaa ctaac 45

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 119

gaattgtgag cggataac 18

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 120

gttttcccag tcacgacg 18

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 121

caactaaagc acccattag 19

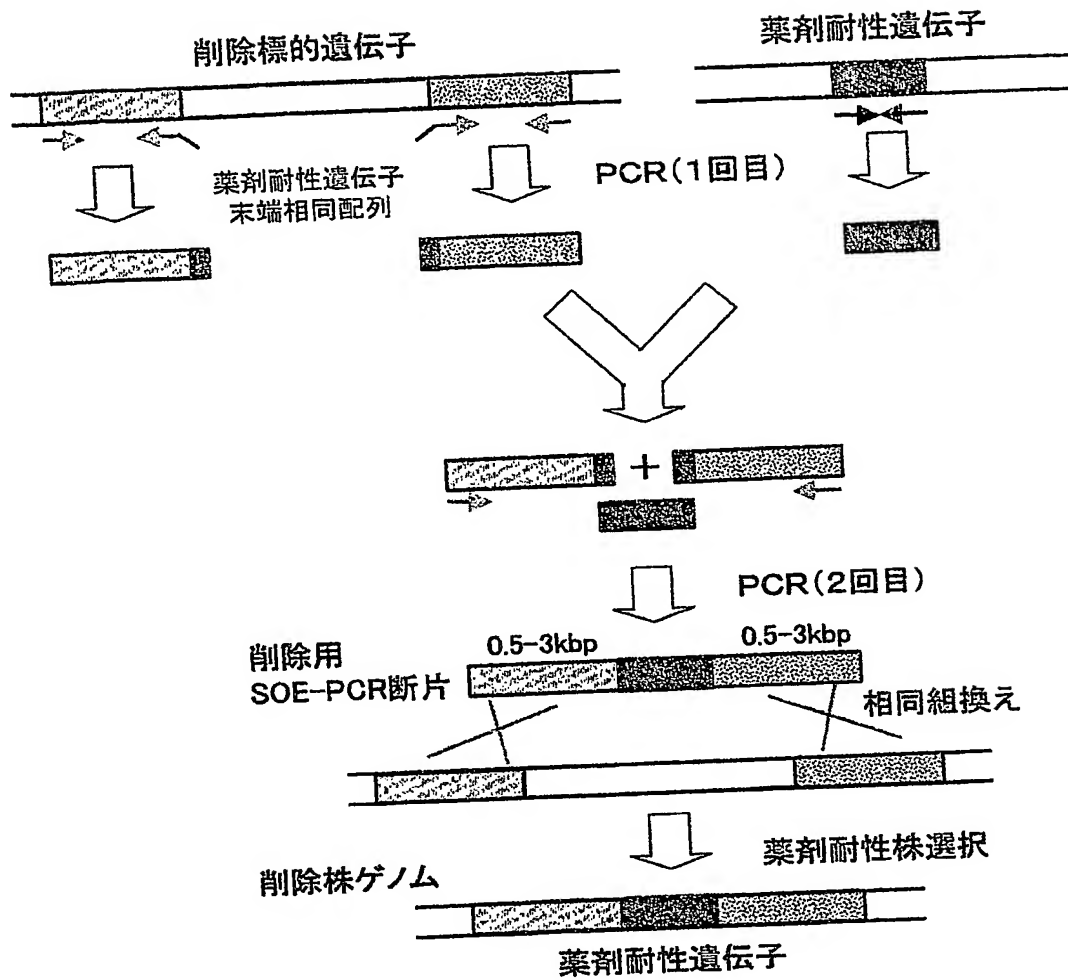
<210> 122

<211> 18

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 122  
cttcaactaa cggggcag 18

【書類名】図面  
【図1】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物にタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供する。

【解決手段】 枯草菌の遺伝子 comA、yopO、treR、yvbA、cspB、yvaN、yttP、yurK、yoza、licR、sigL、mntR、glcT、yvdE、ykvE、slr、rocR、ccpA、yaaT、yvaA、yycH、yacP、hprK、rsiX、yhdK及びylbOのいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか1以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物変異株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2003-379167

受付番号

50301850132

書類名

特許願

担当官

関 浩次

7475

作成日

平成15年11月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年11月 7日

特願 2003-379167

出願人履歴情報

識別番号

[000000918]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住所  
氏名

1990年 8月24日  
新規登録  
東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号  
花王株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**